

Fenyők ektomikorrhiza-képző gombáinak vizsgálata a fülöpházi homokterületen

Seress Diána

Témavezető:
Dr. Kovács M. Gábor

Eötvös Loránd Tudományegyetem
Biológiai Intézet, Növénysszervezettani Tanszék



ELTE Biológus TDK Konferencia
2009.

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés.....	2
Célkitűzések.....	7
Anyag és módszer.....	8
Mintavétel.....	8
Morfológiai vizsgálatok.....	8
Molekuláris vizsgálatok.....	8
Eredmények és értékelésük.....	10
Köszönetnyilvánítás.....	16
Irodalomjegyzék.....	17

BEVEZETÉS

A legtöbb szárazföldi növény gyökerein keresztül valamilyen gombával él együtt mutualista kapcsolatban, ezt az együttélést mikorrhizának nevezzük. Sokféle mikorrhiza-definíció létezik, a fogalom strukturális és funkcionális irányból egyaránt megközelíthető. Egy jól használható meghatározást adott Trappe (1996): a mikorrhizák „az abszorpció kettős szervei, melyek akkor jönnek létre, mikor szimbiotikus gombák kolonizálják a szárazföldi növények többségének és számos vízi növény és epifiton egészséges felszívó szerveit.”

Becslések szerint a szárazföldi növények legalább 90%-a képez mikorrhiza-kapcsolatot. (Smith és Read 2008, Wang és Qiu 2006, Brundrett 2009). A mikorrhizaképző gomba segíti a növény vízfelvételét, és nagy szerepe van egyes szervetlen vegyületek (például foszforvegyületek) és ásványi sók mobilizálásában, melyeket a növény önmagában képtelen lenne hasznosítani (Smith és Read 2008). A gombahifák több szomszédos növény gyökerei között képesek kapcsolatot teremteni, ezáltal valóságos hálózatot hoznak létre a talajban, amelyen keresztül anyagátadás történhet növényegyedről növényegyedre (Simard és mtsai. 1997). Ezt az egységes anyagfelvételi rendszert Wood Wide Webnek (WWW) is nevezik (Helgason és mtsai. 1998). Megoszlanak a vélemények a gombák által közvetített, növényegyedek közötti anyagáramlás működéséről. Egyesek szerint kevés ismeret áll rendelkezésünkre ahhoz, hogy nagy jelentőséget tulajdonítsunk az effajta anyagáramlásnak (Francis és Read 1984, Robinson és Fitter 1999). A mikorrhiza-kapcsolatban a gombapartner szerves anyagokat, vitaminokat és növekedést serkentő anyagokat kap a növénytől (Smith és Read 2008). Az ivaros szaporodásra képes mikorrhizás gombák termőtesteiket csak növénypartnerükkel együtt élve tudják létrehozni.

A mikorrhiza-kapcsolatnak morfológiai és funkcionális szempontból több típusát különíthetjük el. Ezekre a típusokra jellemző, hogy milyen gomba és milyen növény hozza létre őket (**1. táblázat**).

1. táblázat: A főbb mikorrhiza típusok jellemzői (Smith és Read 2008 után)

Jellemzők	Arbuszkuláris mikorrhiza	Ektomikorrhiza	Ektendomikorrhiza	Arbutoid mikorrhiza	Monotropoid mikorrhiza	Erikoid mikorrhiza	Orchid mikorrhiza
Szeptált hifák	-	+	+	+	+	+	+
Szeptátatlan hifák	+	-	-	-	-	-	-
Intracelluláris kolonizáció	+	-	+	+	+	+	+
Gombaköpeny jelenléte	-	+	+ vagy -	+ vagy -	+	-	-
Hartig háló jelenléte	-	+	+	+	+	-	-
Klorofillmentes növénypartner	-	-	-	-	+	-	+
Gombataxon	<i>Glomeromycota</i>	<i>Basidiomycota</i> , <i>Ascomycota</i>	<i>Basidiomycota</i> , <i>Ascomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Basidiomycota</i>
Növénytaxon	<i>Bryophyta</i> , <i>Pteridophyta</i> <i>Gymnophyta</i> <i>Angiophyta</i>	<i>Gymnophyta</i> <i>Angiophyta</i>	<i>Gymnophyta</i> <i>Angiophyta</i>	<i>Ericales</i>	<i>Monotropoideae</i>	<i>Ericales</i> <i>Bryophyta</i>	<i>Orchidales</i>

A mikorrhizák főbb típusai az ekto-, az endo- és az ektendomikorrhizák. Ektomikorrhiza esetében a gombahifák csak a gyökér felszínén és a növény kéregsejtjeinek intercelluláris járataiban találhatók. Endomikorrhizáknál a gombafonalak a növény sejtjeit intracellulárisan is kolonizálják, de ez a kolonizáció valójában az apoplasztikus tér sejtekbe történő betüremkedése (Scannerini és Bonfante-Fasolo 1983, Harrison 1999).

A morfológiai képletek és a kapcsolatban részt vevő partnerek rendszertani hovatartozása alapján történt a mikorrhizák további típusokba sorolása (1. táblázat). Az egyik leggyakoribb és ökológiai szempontból legfontosabb mikorrhizatípus az ektomikorrhiza (EM). A mérsékelt övi fásszárú növények többsége rendelkezik ilyen gombakapcsolattal. A gombapartnerek a bazídiumos-, és a tömlősgombák közé tartoznak, 7-8 ezerre becsülik az ektomikorrhiza-képző gombafajok számát (Smith és Read 2008). A szimbiózisban részt vevő növénypartnerek fajszáma kevés, viszont egyedszámuk egyes ökoszisztémákban nagy lehet (Wang és Qiu 2006, Brundrett 2009). Obligát ektomikorrhizás növény például az összes nyitvatermő, melyek nagy területeken alkotnak társulásokat a mérsékelt övben. Az ektomikorrhizák fő anatómiai és funkcionális egységei a gyökér kéregsejtjei között intercellulárisan jelen lévő Hartig-háló, a gyökér felszínét borító gombaköpeny és a köpeny felszínéről a talajba kiágazó hifák. Az anyagátadás a gyökérsejtek és a Hartig-háló hifái között megy végbe, míg a víz-és tápanyagfelszívást a kiágazó hifák végzik. A gombaköpeny védelmi és raktározó szerepet tölthet be. Az ektomikorrhiza legtöbb morfológiai-anatómiai jellemzőjét, például a köpeny színét, felszíni struktúráit és a Hartig-háló szerkezetét nagyrészt a gomba határozza meg. Ezeknek a morfológiai bélyegeknél a segítségével gyakran

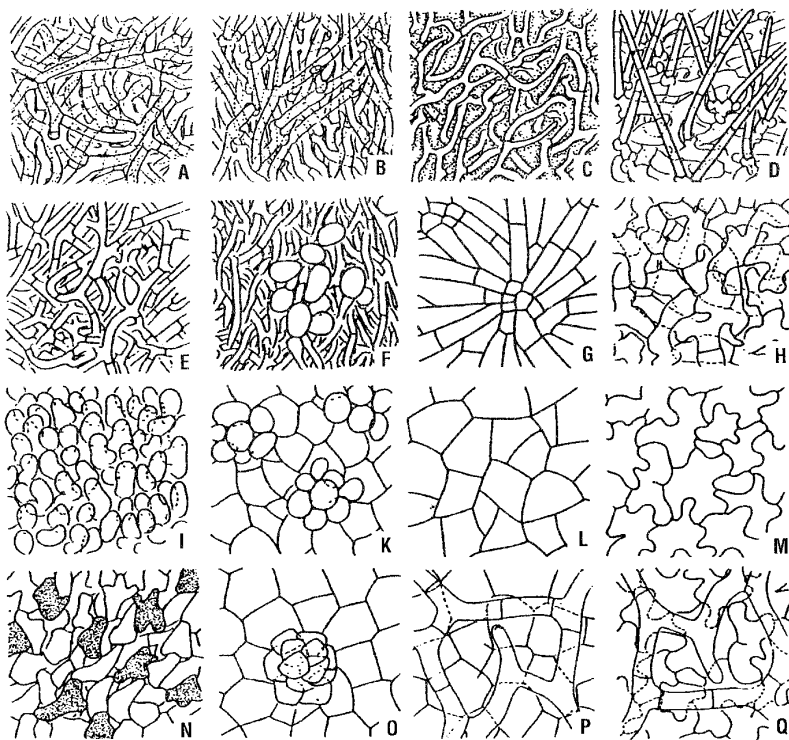
nemzetség szinten, ritkán pedig akár faji szinten meg lehet határozni a gombát. (Agerer 1986-2008, 1996-2008, 2006, De Roman és mtsai. 2005, Rinaldi és mtsai 2008)

Az ektomikorrhizák köpenyét alapvetően két fő típusba sorolhatjuk. A lazább szerkezetű, megnyúlt, hifaszerű sejtekből álló köpenyt plektenchimatusnak, a tömöttebb, differenciáltabb szerveződésű, izodiametrikus sejtekből állót pszeudoparenchimatusnak nevezzük (Agerer 1991, Jakucs 1996). A két fő típusnak számos altípusa létezik (**1. ábra**). Egy ektomikorrhiza gombaköpenyt több, különböző típusú réteg is alkothat. Egyes ektomikorrhiza-típusoknál a köpenyfelszínen cisztidákat figyelhetünk meg, melyek lehetnek hegyesek, palack-, orsó-, vagy bot alakúak, ujj-, vagy gömbszerűek, de akár a normál hifákhoz hasonlóak is lehetnek.

1. ábra: A gombaköpeny fénymikroszkópos morfológiája felülnézetben.

A: Plektenchimatus, a hifakötegek gyűrűszerű összenövésével; **B:** Plektenchimatus, a hifák szabálytalanul futnak le, nincs jellegzetes mintázat, de a hifák lefutási iránya a gyökér hosszának megfelelő; **C:** Plektenchimatus, a hifák közt ragadós anyaggal; **D:** Plektenchimatus, a hifák hálózatosan helyezkednek el, jellegzetes cisztidákkal; **E:** Plektenchimatus, a hifák hálózatosak, gyakran szögletesen elágazók; **F:** Plektenchimatus, helyenként gömbölyű sejtek helyezkednek el a köpeny felszínén; **G:** Plektenchimatus, a hifák csillagszerűen illeszkednek, szorosan záródnak; **H:** Átmeneti típus a plektenchimatus és a pszeudoparenchimatus között, a szabálytalan hifák hálót képeznek;

I: Plektenchimatus, a köpeny termőrétegszerű, majdnem merőlegesen álló, vastag, néha enyhén görbült hifavégekkel borított, amelyeket olajcseppek töltene ki; **K:** Pszeudoparenchimatus, szögletes sejtekből álló, gömbölyű sejtek csoportjaival; **L:** Pszeudoparenchimatus, a köpeny szögletes sejtekből áll; **M:** Pszeudoparenchimatus, a köpenyben epidermoid sejtekkel; **N:** Pszeudoparenchimatus, a köpeny néhány sejtje cseppeket tartalmaz, amelyek szulfovanilinnel festődnek, a sejtek alakja változatos; **O:** Pszeudoparenchimatus, a köpenyben szögletes sejtekkel és lapos sejtcsoportokkal; **P:** Pszeudoparenchimatus, a köpeny sejtjei szögletesek, finom hifahálóval a felszínükön; **Q:** Pszeudoparenchimatus, epidermoid sejtekkel, finom hifahálóval.



A Hartig-háló zárwatermők ektomikorrhizái esetében általában a gyökérnek csak egy sejtrétegét, az epidermist veszi körül. Ezzel ellentétben a nyitwatermők Hartig-hálója több sejtréteget érint, benyomul a kéregsejtek közé. Az aktív mikorrhizás zóna csak a gyökér fiatal

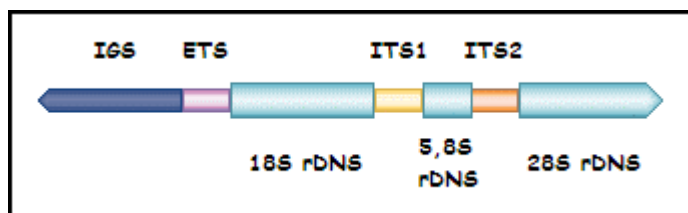
részein, néhány milliméterrel a gyökércsúcs alatt, a felszívási zónában található, a csúcstól távolabbi, idősebb régiókban a Hartig-háló hifái már előregednek, a köpeny viszont még sokáig fennmaradhat a kapcsolat inaktívvá válása után. A köpennyel borított területeken nincsenek gyökérszőrök, a teljes vízfelvételt a kiágazó gombahifák végzik. Egyes gombataxonokban a kiágazó hifák kötegekbe rendeződve rhizomorfákat alkotnak, melyek nagyobb mennyiségű víz gyorsan történő szállítását valósítják meg a talajból a gyökér felé, vagy a gomba köpenye és a termőtest között (Agerer és Iosifidou 2004). A rhizomorfák lehetnek differenciálatlanok, ekkor a hifák azonos átmérőjűek, vagy lehetnek differenciáltak, ekkor a centrális hifák átmérője nagyobb a szélsőkénél, a vastagabb hifák központi köteget alkothatnak és a szeptumok feloldódhatnak bennük (Agerer 1991, Agerer és Iosifidou 2004).

Egy terület ektomikorrhizas gombabiótájáról sokkal pontosabb képet kapunk, mikorrhizáikat vizsgálva és azonosítva a termőtest-alapú térképezéshez képest, egyrészt mert a termőtestképzés nagyon idényjellegű, másrészt mert számos ektomikorrhiza-képző gombának nincs termőtestje (Horton és Bruns 2001). Az ektomikorrhizák azonosításának egyik lehetősége, amikor sikerül direkt – általában rizomorfák általi – kapcsolatot találni egy ektomikorrhiza és az azt képző gomba termőteste között. Ha sikerül is egy gombafaj ektomikorrhizájának részletes leírását elvégezni (Agerer 1996-2008) sok gombát nem lehet egyértelműen azonosítani az ektomikorrhiza morfológiai-anatómiai jellegzetességei alapján: előfordul, hogy két faj ektomikorrhizáját nem lehet megkülönböztetni morfológiai alapon, például a *Lactarius picinus* Fr. és a *Lactarius fuliginosus* Fr. ektomikorrhizája anatómiai alapon megkülönböztethetetlen (Kraigher és mtsai. 1995) és például a fehér szarvasgomba fajok ektomikorrhizái is teljesen hasonló anatómiájúak (Kovács és Jakucs 2006). Ilyen esetekben segítségünkre lehet az az ektomikorrhizáz képző gombák molekuláris taxonómiai azonosítása.

A gombák molekuláris taxonómiai vizsgálatainál a legtöbbször használt lókuszek a magi riboszómális génkomplex (nrDNS) egyes szakaszai. Az rDNS génkomplex egyes régióinak variabilitása eltérő mértékű, ezért az egyes DNS-szakaszok különböző taxonómiai szintű azonosításokra használhatóak. Az nrDNS 5,8 S génjét az internal transcribed spacer (ITS) régió határolja két oldalról (ITS1 és ITS2). Az ITS régió átíródik, utána azonban splicing folyamat során kivágódik. Az ITS2 régió másodlagos szerkezeti tulajdonságainak fontos szerepe van a splicing mechanizmust irányító enzim kötődésében, ezért összességében az ITS a nrDNS génkomplexben lévő többi át sem íródó intronhoz (például az IGS) képest konzervatívabb szakasz. Az ITS általában fajsztípusú azonosításra alkalmazható, de az intraspecifikus variabilitásban jelentős különbségek lehetnek az egyes gombák között.

Gomba specifikus ITS primerek állnak rendelkezésünkre (pl. Gardes és Bruns 1993), ez nagyon fontos az ektomikorrhizát alkotó gomba és növény DNS-ének elkülönítésére. Ilyen gombaspecifikus primerek használatakor a polimeráz láncreakció (PCR) reakció során csak a gomba DNS-e amplifikálódik. Ezen tulajdonságai miatt az ITS-régiót molekuláris taxonómiai vizsgálatoknál széles körűen alkalmazzák

2.ábra A nrDNS egy egységének vázlatos szerkezete



Az Alföldön több őshonos növény ektomikorrhizáinak leírására is irányultak vizsgálatok, ilyen növények például a *Populus alba* (fehér nyár) és a *Quercus robur* (kocsányos tölgy), a *Helianthemum ovatum* (ékes napvirág), és a *Fumana procumbens* (naprózsa) (Jakucs és mtsai 1999, Magyar és mtsai. 1999, Kovács és Jakucs 2001, Jakucs 2002, Kovács 2002, Jakucs és Csiha 2002-2004).

A *Populus alba* ektomikorrhizáinak vizsgálata során morfológiai alapon 70 ektomikorrhiza-típust különítettek el, ezek közül 14-et írtak le részletesen (Jakucs 2002). A *Quercus robur*nak is számos ektomikorrhiza-képző gombapartnerét leírták (Jakucs és Csiha 2002-2004).



3. ábra: Betörő fenyő a fülöpházi homokgyepben

A Fülöpháza melletti homokterületet egy jellegzetes kiskunsági homokgyep, mely Magyarország botanikai szempontból egyik leginkább kutatott élőhelye. A területen a mikorrhizákra irányuló kutatások is folytak. Mikorrhizáltsági sátsz vizsgálat során 89 növényfaj mikorrhizáltsági státuszát vizsgálták (Kovács és Szigetvári 2002). Az ékes napvirág ektomikorrhiza-partnereként írták le az aszkuszos, még azonosítatlan „*Helianthemirhiza hirsuta*”-t (Kovács és Jakucs 2001) és „*Helianthemirhiza latihypha*”-t (Kovács 2002). A

naprózsa *Inocybe heimii* (Magyar és mtsai. 1999) és a *Hebeloma ammophilum* (Jakucs és mtsai. 1999) gombafajokkal képzett ektomikorrhizáit szintén a fülöpházi területről írták le.

A Fülöpháza melletti homokpusztagyepet egy ültetett fenyőerdő (*Pinus nigra* - *Pinus sylvestris*) határolja. Fenyőegyedeket a szomszédos nyílt homokgyepben az erdei ültetvénytől akár több 100 méter távolságra is találunk. A fenyő a területen egyértelműen inváziósnak tekinthető. A *Pinus*-fajok obligát ektomikorrhizas növények, mert gyökereik szőrözöttsége és elágazási rendszere gyengén fejlett, gombapartnerük nélkül nem tudják felvenni a szükséges vizet és tápanyagokat. A Fülöpháza melletti homokgyepen korábban történt fenyő-ektomikorrhiza vizsgálatok (Somogyi 2003) során hat ektomikorrhiza morfortípust különítettek el, ebből kettő morfortípust sikerült molekulárisan azonosítani.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk fő célkitűzése a fülöpházi homokterületen a fenyők ektomikorrhizáinak részletes anatómiai vizsgálata, azonosítása, és az erdőben lévő és a gyepbe betörő fenyők ektomikorrhizáinak összehasonlítása volt. Hipotézisünk szerint a gyepbe betörő és az erdőben lévő fenyők részben más gombapartnerekkel alakítanak ki ektomikorrhiza-kapcsolatokat. Vizsgálataink egyik legfontosabb hosszú távú célkitűzése, hogy az inváziós és az őshonos növényeket kolonizáló EM gombák összehasonlításával következtessünk, hogy melyek lehetnek a vizsgált félszáraz területek generalista és specifikus ektomikorrhiza-képző gombái.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mintavétel

Mintavételi területünk a Kiskunsági Nemzeti Parkban a Fülöpháza melletti nyílt homokpusztagyep területén volt. A gyökérmintákat a telepített fenyőerdő talajából, illetve az erdőtől a szomszédos homokgyepbe betörő fenyőegyedek alól gyűjtöttük 2007. október és 2009. július között. A talajból 15 cm X 15 cm-es kockákat vágunk éles bárd segítségével, majd a talajmintákat nylon zacskóba helyezve szállítottuk laboratóriumba, ahol 4°C-on tároltuk feldolgozásukig.

Morfológiai vizsgálatok

A talajmintákat maximum 4 nap tárolás után csapvízben áztattuk. A gyökereket víz alatt csipesszel szétbontottuk, és a homokszemcséktől ecsettel megtisztítottuk. Sztereomikroszkóp (Nikon SMZ 1000) segítségével morfológiai alapon típusokat különítettünk el, az egyes morfortípusokat lefotóztuk (Q-Imaging kamera), és a későbbi vizsgálatokhoz mindegyik típusból néhány ektomikorrhizát 70 %-os etanolban és CTAB pufferben (2% CTAB, 20 mM EDTA pH 8, 100 mM Tris-HCl pH 9 és 1,4 mM NaCl) fixáltunk. Részletes ektomikorrhiza leírásaink Agerer módszereit és nevezéktanát követik (Agerer 1991), melyek az ektomikorrhizák morfológiai és anatómiai vizsgálatában a nemzetközileg elfogadott módszereket egyesítik. Jellemeztük az ektomikorrhizák elágazási típusait, a gyökérvégek alakját, a gombaköpeny felszínét, az esetleg előforduló rhizomorfákat és megállapítottuk az ektomikorrhizák színét. Milliméter papír segítségével lemértük az ektomikorrhizák hosszát, valamint az el nem ágazó végek hosszát és átmérőjét.

Sztereómikroszkóp alatt az ektomikorrhizákat bonctű segítségével „megnyúzva” köpenypreparátumokat készítettünk. A köpenydarabokat tárgylemezen, 24 x 32 mm-es fedőlemezzel PVLG-ben (PolyVinyl-Lacto-Glycerol) fedtük le, majd Nikon Eclipse 80i fénymikroszkóp Nomarski optikájával vizsgáltuk. A köpenypreparátumokról a fénymikroszkópra szerelt Olympus kamerával digitális képeket készítettünk. A gombaköpenyeket Agerer munkája (Agerer 1991) alapján típusokba soroltuk.

Molekuláris vizsgálatok

A molekuláris vizsgálatok során a CTAB pufferben, vagy a 70 %-os etanolban fixált mikorrhizákból izoláltunk teljes DNS-t. A CTAB pufferben fixált minták esetében a DNS kivonást a CTAB-protokoll (Gardes és mtsai. 1993) szerint végeztük. A mintákat 400 µl CTAB puffert és kevés sterilizált kvarchomokot tartalmazó Eppendorf csövekben szétdörzsöltük. Az így homogenizált anyagot 62,5°C-on 60 percig inkubáltuk. Ezután egy térfogatnyi kloroformot adtunk a mintákhoz, majd 13 200 g-n centrifugáltuk 30 percig

(Hettich MIKRO 200). A fölülúszót megtartva a kloroformos tisztítást megismételtük. A tiszta felülúszóban oldott DNS-t kicsapattuk két térfogat 96%-os etanol és 30 µl nátrium-acetát (pH 4,6; 3M, Sigma) hozzáadásával egy éjszakán át -20°C-on. Ezután a mintákat 50 percig centrifugáltuk 13 200 g-n, majd kétszer mostuk 70%-os etanollal. Az Univapo 100 ECH vákuumcentrifugával kiszárított DNS-t 30 µl steril milli-Q vízben oldottuk fel. A 70 %-os etanolban fixált minták esetében a DNS kivonást EZNA Fungal DNA Mini Kittel (OMEGA Bio-Tek) vittük véghez a cég protokollját követve, kisebb módosítással: a minták homogenizálása a FG1 pufferben történt száraz homogenizálás helyett.

A PCR amplifikációt ITS1F és ITS4 primer párral (White et al 1990, Gardes és Bruns 1993) végeztük. A reakcióelegy 20 µl-nyi térfogata 1 µl vagy 2 µl templátot, 2 µl puffert (Fermentas, 10X (NH₄)₂SO₄-MgCl₂) 2 µl 25mM MgCl₂-ot (Fermentas) 2 µl 2 mM dNTP-t (Fermentas), mindkét primerből (10 µM) 1 µl-t, *Taq* polimerázból 1 µl-t (Fermentas) és milli-Q vizet tartalmazott. A PCR reakcióhoz BIOMETRA TGradient készüléket használtunk a következő programmal: 5 perc denaturáció 94°C-on, ezután 35 cikluson keresztül 30 másodperc denaturáció 94°C-on, 30 másodperc annealing 52,2°C-on, 90 másodperc extenzió 72°C-on. A ciklusok után 10 perc végső extenzió következett 72°C-on. A PCR készülék fűtési-hűtési sebességét 1°C/másodpercre állítottuk.

A termékeket etídium-bromidot tartalmazó 1.5 %-os agaróz gélen TBE pufferben futtattuk (BioRad Mini Sub Cell GT) és a géleket BioRad géldokumentációs rendszerrel dokumentáltuk. Amennyiben nem kaptunk detektálható PCR terméket egy mintáról, a templát DNS- mennyiségét emelve és csökkentve újabb PCR-t indítottunk. Amennyiben sikeres volt az amplifikáció, az adott mintából egy ismétlő PCR reakciót indítottunk, hogy ezáltal a szekvenáláshoz elegendő mennyiségű (legalább 70 µl) PCR-terméket kapjunk. A PCR-termékeket Viogene PCR-termék tisztító kittel tisztítottuk a cég protokollját követve. A tiszta terméket 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk meg.

A szekvenáláshoz ABI BigDye 3.1es (Applied Biosystem) kitet használtunk, a „cycle sequencing” reakció során az amplifikációhoz használt primereket alkalmaztuk. A gyártó utatításai szerint készítettük elő a mintáinkat, a „futtatást” pedig egy szolgáltató laborban (MTA SzBK) végezték ABI 3100 (Applied Biosystem) készülékeken. A szekvenciák kromatogramjait STADEN (Staden és mtsai. 2000) programmal ellenőriztük. A szekvenciákat a BLASTn (Altschul és mtsai. 1990) kereséssel (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) vetettük össze a különböző nyilvános adatbázisokban elhelyezett szekvenciákkal.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESLÉSEK

A Fülöpháza melletti homokterületről összesen 30 talajmintát gyűjtöttünk, ebből 18 minta a telepített erdő talajából, 12 pedig a gyepe betörő fenyők alól származott.

A talajból kimosott fenyő gyökerekről 31 ektomikorrhiza morfortípust különítettünk el (**2. táblázat**), melyekről részletes morfológiai leírást készítettünk. A morfortípusok anatómiai jellemzéséhez eddig 120 köpenypreparátum készült (**4-9. ábra**).

2.táblázat: A Fülöpháza melletti homokterületen gyűjtött fenyő ektomikorrhiza morfortípusok főbb jellemzői.

Morfortípus sorszáma	Elágazási típus	Köpeny felszíne	Köpeny színe	El nem ágazó végek alakja	Köpeny típus *	Előfordulás **	BLAST***
1.	dichotomikus	sima vagy enyhén vattás	sötétbarna világosabb, vörösesbarna véggel	egyenes-hajlott	Q	GY, E ₂	
2.	koralloid	sima vagy enyhén vattás	sötétbarna	egyenes-hajlott	L	GY, E ₂	
3.	dichotomikus	gyapjas	rózsaszínes világosbarna világosabb véggel	hajlott	Q	GY	
4.	dichotomikus	sima vagy enyhén vattás	sötétbarna	hajlott	P és Q	GY	
5.	dichotomikus or koralloid	gyapjas	barna világos véggel	hajlott	H és M	GY	
6.	koralloid	sima vagy enyhén vattás	krémszínű	egyenes	E	GY, E ₂	<i>Rhizopogon</i> sp.
7.	dichotomikus vagy egyszerű	gyapjas	barna világos véggel	egyenes-hajlott	L	GY, E ₂	
8.	dichotomikus	vattás	sötétbarna	befűzött	I-szerű	GY, E ₁ , E ₂	
9.	dichotomikus vagy egyszerű	vattás	középbarna	egyenes-hajlott	L	GY	<i>Geopora arenicola</i>
10.	dichotomikus	enyhén vattás	őzbarna világos véggel	hajlott	M	GY	
11.	dichotomikus	fonalas	barna fehér hálózatos mintával	egyenes-hajlott	B	GY	<i>Rhizopogon roseolus</i>

2. táblázat folytatás

Morfotípus sorszáma	Elágazási típus	Köpeny felszíne	Köpeny színe	El nem ágazó végek alakja	Köpeny típus *	Előfordulás **	BLAST***
12.	dichotomikus	vattás	barnássárga fehér véggel	egyenes	B	E ₁	<i>Ascomycota</i> sp.
13.	dichotomikus	vattás	világos barna világosabb véggel	gömbült	E	GY, E ₁ , E ₂	<i>Cortinarius</i> sp.
14.	dichotomikus	gyapjas	fekete	hajlott-gömbült	Parketta-mintás	E ₁	<i>Cenococcum geophilum</i>
15.	dichotomikus vagy egyszerű	gyapjas	barna világos véggel és fehér hálózattal	hajlott	D és Q	E ₁	<i>Ascomycota</i> sp.
16.	dichotomikus	sima	barna fényes véggel	hajlott	E és M	E ₁	
17.	dichotomikus	sima	trikolor (sötétbarna-vöröses-világos)	befűzött	L és P	GY, E ₂	
18.	dichotomikus	sima	őzbarna	egyenes	P	E ₂	
19.	korallóid	enyhén vattás	sötétbarna fehér hálózatos mintával	hajlott-gömbült-befűzött	K-szerű	E ₂	
20.	dichotomikus	vattás	vörösesbarna	egyenes-hajlott	P	E ₂	
21.	egyszerű	sima	krémszínű	egyenes-hajlott	E-szerű	E ₂	
22.	dichotomikus	vattás	krémszínű	hajlott-gömbült	B és E	E ₂	
23.	dichotomikus	sima	sárga fehér véggel	egyenes-hajlott	Q	GY	
24.	korallóid	vattás	őzbarna	hajlott	L-szerű	GY	
25.	dichotomikus	vattás	sötétbarna sárga hálózatos mintával	hajlott-gömbült	B	E ₂	
26.	dichotomikus	sima	vörösesbarna világos véggel	egyenes-hajlott	H és M	GY	
27.	dichotomikus	enyhén vattás	barnássárga világos véggel	hajlott-gömbült	H	GY	
28.	dichotomikus	enyhén vattás	barna világos véggel	hajlott-befűzött	H	GY	
29.	dichotomikus	sima	sötétbarna	gömbült-befűzött	H	GY	
30.	korallóid	sima	világos barna	egyenes	I-szerű	GY	<i>Hebeloma mesophaeum</i>
31.	dichotomikus	vattás	krémszínű	hajlott	E	GY	<i>Suillus variegatus</i>

2. táblázat folytatás

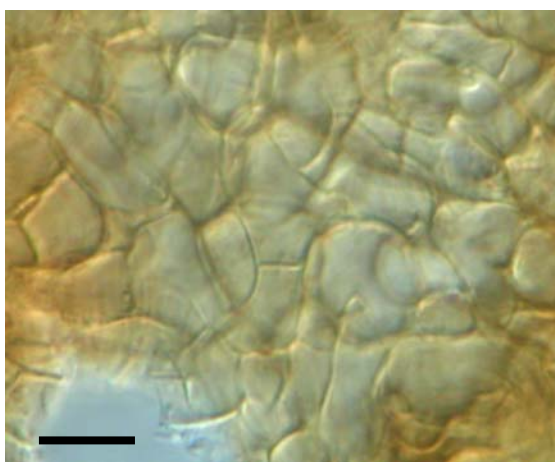
Morfotípus sorszáma	Elágazási típus	Köpeny felszíne	Köpeny színe	El nem ágazó végek alakja	Köpeny típus *	Előfordulás **	BLAST***
32	koralloid	vattás	rózsaszínes világosbarna fehér véggel	egyenes-hajlott	P	GY, E ₂	
33	dichotomikus	gyapjas	középbarna	hajlott	P	GY	<i>Pezizales</i> sp.
34	dichotomikus	sima	sötétbarna	egyenes	E	E ₂	
35	dichotomikus	sima-enyhén vattás	középbarna	gömbült-befűzött	B és H	GY	<i>Inocybe</i> sp.
36	dichotomikus	sima-enyhén vattás	középbarna	hajlott-gömbült	L	GY	<i>Russulaceae</i>
37	dichotomikus	sima	sötétbarna	gömbült-befűzött	B	GY	<i>Tomentella</i> sp.
38	dichotomikus	sima-enyhén vattás	tompa kávébarna	egyenes-hajlott	B és H	GY	<i>Inocybe</i> sp.

* A köpenytípusokat jelölő betűk a „Bevezetés” rész 1. ábráján található betűkódoknak felelnek meg.

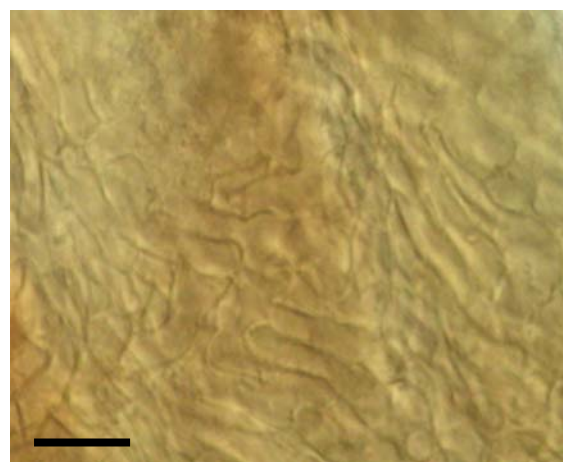
** GY= gyeptől felvett minta, E₁ és E₂= az „1-es”, illetve a „2-es” erdei területről felvett minták.

*** Az ITS szekvenciák BLASTn keresésével kapott eredmények

Négy morfortípust molekuláris módszerekkel faji szinten azonosítottunk, ezek a *Geopora arenicola* (4. ábra) a *Suillus variegatus*, *Rhizopogon roseolus* (5. ábra), *Hebeloma mesophaeum* és fajokkal mutattak nagy szekvenciabeli hasonlóságot. Öt morfortípust nemzetség szinten sikerült azonosítani, ezeket a *Rhizopogon*, *Tomentella*, *Inocybe*, *Hebeloma* és *Cortinarius* nemzetségekbe tartozó gombák képezték. Egy morfortípust a *Russulaceae* családba, egyet pedig a *Pezizales* rendbe tartozó gomba hozott létre.



4. ábra: *Geopora arenicola* EM köpeny szerkezete. Mércé: 10 µm



5. ábra: *Rhizopogon roseolus* EM köpeny szerkezete. Mércé: 10 µm

A *Rhizopogon*, *Tomentella*, *Inocybe*, *Hebeloma* és *Cortinarius* fajok ektomikorrhizáinak morfológiája hasonló a megfelelő nemzetségek korábban leírt ektomikorrhizáihoz (Agerer 1986-2008 és 1996-2008).

A *Geopora arenicolán* kívül még öt, nem azonosított aszkuszos gomba ektomikorrhizáit találtuk meg, melyek morfológiájukat tekintve mutatják a korábban leírt aszkuszos ektomikorrhizák jellegzetességeit, mint például az anguláris, vastag falú sejtekből álló gombaköpenyt (4. ábra) (Tedersoo és mtsai. 2006, Erős és mtsai 2008). Korábbi eredmények szerint a tömlős ektomikorrhiza képző gombák száraz, félszáraz élőhelyeken nagyobb arányban fordulnak elő más területekhez képest (Tedersoo és mtsai. 2006, Smith és mtsai. 2007).



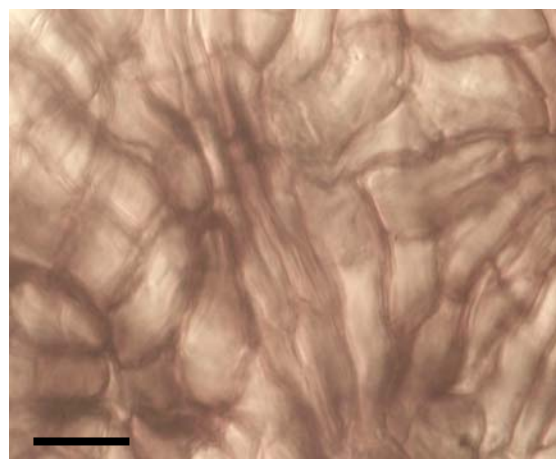
6. ábra: 32-es morfotípusú EM.
Mérce: 1 mm



7. ábra: Még nem azonosított EM.
Mérce: 1 mm



8. ábra: *Cenococcum geophilum* EM.
Mérce: 1 mm



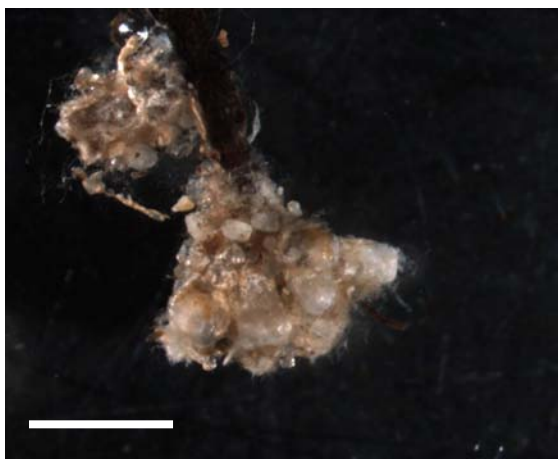
9. ábra: *Cenococcum geophilum* EM
köpeny szerkezete. Mérce: 10 µm



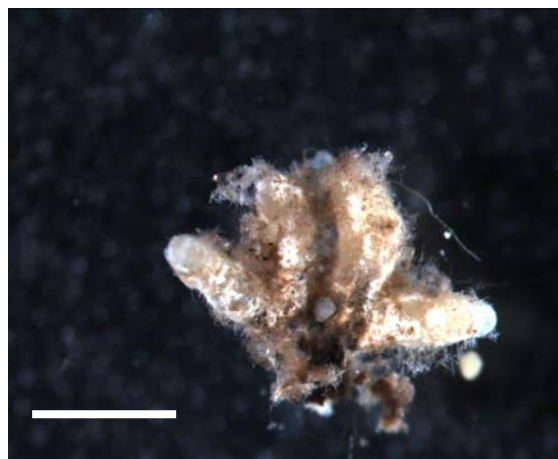
10A ábra: *Rhizopogon* sp. termőtestek.



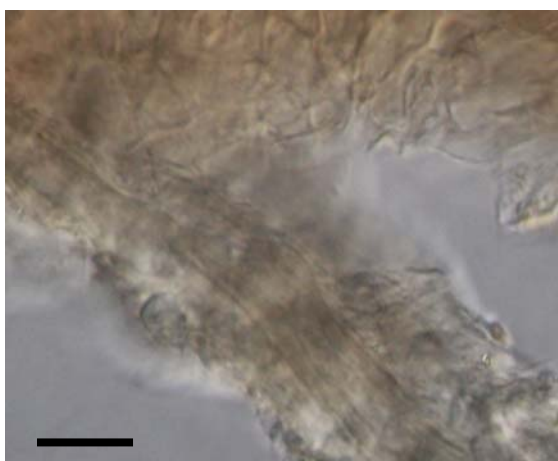
11A ábra: *Suillus variegatus* termőtest.



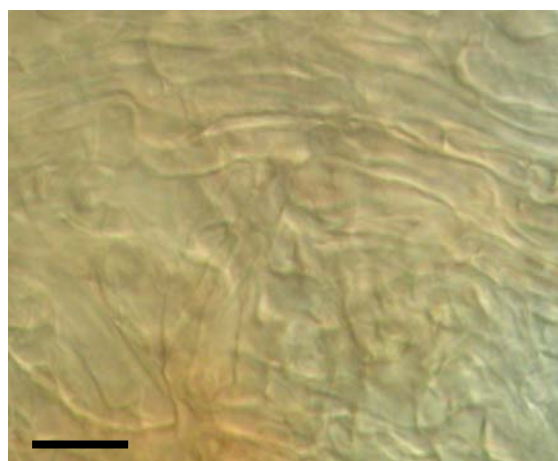
10B ábra: *Rhizopogon* sp. EM.
Mérce: 1mm



11B ábra: *Suillus variegatus* EM.
Mérce: 1 mm



10C ábra: *Rhizopogon* sp. EM köpeny és a rhizomorfa szerkezete. Mérce: 10 μ m



11C ábra: *Suillus variegatus* EM köpeny szerkezete. Mérce: 10 μ m

Az *Inocybe*, *Hebeloma* és *Cortinarius* nemzetségek több fajtát már kimutatták alföldi területeken mind termőtest (Babos 1999, Nagy 2004, Nagy és Gorliczai 2007), mind ektomikorrhiza szintjén. Az *Inocybe heimiit* (Magyar és mtsai. 1999) és a *Hebeloma ammophilum* (Jakucs és mtsai. 1999) leírták a területen őshonos *Fumana procumbens* gombapartnereként is. Mindkét nemzetség nehéz taxonómiájú csoport, és a fülöpházi területről is számos, sokszor nehezen elkülöníthető fajt ismerünk (Babos 1999, Nagy 2004, Nagy és Gorliczai 2007). Mivel a naprózsa mindkét ektomikorrhiza-képző gombáját termőtest és ektomikorrhiza ITS restrikciós szakasz hossz polimorfizmus (RFLP) összevetéssel azonosították, szekvencia nem áll rendelkezésünkre az összevetéshez (Jakucs és mtsai. 1999, Magyar és mtsai. 199), továbbá a közel rokon *Inocybe* és *Hebeloma* fajok ektomikorrhizái anatómiailag nem megkülönböztethetők, nem zárható ki, hogy akár ugyanazon fajok kolonizálták a fenyőket is. Mindenesetre megállapítható, hogy az *Inocybe* és *Hebeloma* nemzetségek az őshonos növények mellett kolonizálják a tájidegen fenyőket is.

A Somogyi diplomamunkájában (2003) szereplő hat morfortípus közül négy az általunk felvett mintákban is jelen volt. A *Thelephora terrestris* mikorrhizájával eddigi gyűjtéseink során nem találkoztunk. A *Cenococcum geophilum*-ot (**8-9. ábra**) csak az erdei mintákban találtuk meg ellentétben Somogyi munkájával. A *Suillus variegatus*, a *Geopora arenicola*, a *Hebeloma mesophaeum* fajok, a *Russulaceae*, a *Pezizales*, az *Inocybe*, a *Tomentella* taxonokba tartozó fajok és tizenhárom, eddig még nem azonosított gomba által képzett morfortípust csak a gyepből felvett mintákban találtuk (**2. táblázat**).

A *Cenococcum geophilum* fajt, a *Cortinarius* fajt és még tíz morfortípust, amelyet általunk még nem azonosított gomba képez csak a telepített erdőből felvett mintákban találtuk meg (**2. táblázat**).

A *Rhizopogon roseolus* és hat morfortípus az erdei- és a gyepből felvett mintákból is előkerült (**2. táblázat**).

Az eddigi eredményeink alapján megállapítható, hogy vannak csak az erdőben vagy csak a gyeppen előforduló és a fásszárú növényekkel ott kapcsolatban lévő ektomikorrhiza-gombák.

Fontos eredmény, hogy sikerült csak a fenyőt kolonizáló, tájidegen ektomikorrhiza-képző gombát kimutatnunk: A fülöpházi területen a *Suillus* és *Rhizopogon* nemzetségbe tartozó gombafajok (**10 és 11. ábra**) egyértelműen tájidegenek, amelyek specifikusan fenyők kísérleti rendszerekben is sokat vizsgált, ektomikorrhiza partnerei (Carney és Chambers 1999a,b). Az általunk gyűjtött *Rhizopogon* és *Suillus* ektomikorrhizák morfológiailag hasonlóak a korábban leírt megfelelő ektomikorrhizákhoz. A *Rhizopogon* nemzetség mintegy

150 fajt számlál, taxonómiája sok ellentmondással terhelt (Carney és Chambers 1999). A *Suillus* genusba is sok - körülbelül 100 - faj tartozik. A két gombanemzetség eredetileg csak az északi féltekén honos, de például a *Rhizopogon* fajokat növénypartnereikkel együtt a déli félteke egyes részeire is behurcolták, elterjedési területük fokozatosan nő (Cairney és Chambers 1999a). Mindkét gomba nemzetség a szigorúan védett, nemzetközi magterületnek minősülő fülöpházi homokgyepben egyértelműen tájidegennek tekinthető. Habár eddigi ismereteink alapján ezek a gombák nem képezhetnek ektomikorrhizát a terület őshonos növényeivel, arról nincsenek ismereteink, hogy milyen mértékben befolyásolják a terület őshonos ektomikorrhiza képző gomba közösségét és egész talaj (mikro)biótáját.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani Prof. Dr. Böddi Béla tanszékvezetőnek, hogy az ELTE Növényyszervezettani Tanszékén végezhettem munkámat. Szeretném megköszönni a munkámban nyújtott sok segítséget témavezetőmnek, Dr. Kovács M. Gábornak, a technikai segítséget pedig Dózsainé Kerekes Piroskának. A kutatásokat az OTKA (K72776) támogatta.

IRODALOMJEGYZÉK

- Agerer, R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In: Norris, J. R., Read, D. J., Varma, A. K. (szerk) Techniques for the study of mycorrhiza. Methods Microbiol. 23: 25-73.
- Agerer, R. 1986–2008. Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, München.
- Agerer, R., Danielson, R.M., Egli, S., Ingleby, K., Luoma, D., Treu, R. 1996-2008. Description of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd, München
- Agerer, R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. Mycological Progress 5: 67-107.
- Agerer, R., Iosifidou, P. 2004. Rhizomorph structures of Hymenomycetes: A possibility to test DNA-based phylogenetic hypotheses. In: Agerer, R., Piepenbring, M., Blanz, P. (szerk.) Frontiers in basidiomycote mycology. IHW-Verlag, Eching, 249-302.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- Babos, M. 1999. Higher fungi (Basidiomycetes) of the Kiskunság National Park and its environs. In: Lőkös, L., Rajczy, M. (szerk.) 1999. The Flora of the Kiskunság National Park II. Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, pp. 199-299.
- Brundrett, M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. Plant and Soil 320: 37-77.
- Cairney, J., Chambers, S. 1999a. *Rhizopogon*. In: Cairney, J., Chambers, S. Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile, Springer, Berlin pp. 129-152.
- Cairney, J., Chambers, S. 1999b. *Suillus*. In: Cairney, J., Chambers, S. Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile, Springer, Berlin, pp. 33-55.
- De Roman, M., Claveria, V., De Miguel, A. M. 2005. A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. Mycol Res. 109: 1063-1104
- Erős-Honti, Zs., Kovács, G. M., Szedlay, Gy., Jakucs, E. 2008. Morphological and molecular characterization of *Humaria* and *Genea* ectomycorrhizae from Hungarian deciduous forests. Mycorrhiza 18: 133-143.
- Erős-Honti, Zs., Jakucs, E. 2009. Characterization of beech ectomycorrhizae formed by species of the *Pachyphloeus-Amylascus* lineage. Mycorrhiza 19: 337-345.

- Francis, R., Read, D. J. 1984. Direct transport of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium. *Nature* 307: 53-56.
- Gardes, M., Bruns, T. D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Gardes, M., White, T. J., Fortin, J. A., Bruns, T. D., Taylor, J. W. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can. J. Bot.* 69: 180-190.
- Harrison, M. J. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 361–89.
- Helgason, T., Daniell T. J., Husband, R., Fitter, A. H., Young, J. P. W. 1998. Ploughing up the wood-wide web? *Nature* 394: 431.
- Horton, T. R., Bruns, T. D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Mol. Ecol.* 10: 1855-1871.
- Jakucs, E. 1996. Az ektomikorrhizák morfológiai vizsgálatának módszerei. *Mikol. Közl.* 35: 9-30.
- Jakucs, E., Bratek, Z., Agerer, R. 1998. *Genea verrucosa* Vitt.+ *Quercus robur* L. Descr. *Ectomyc.* 3: 19-23.
- Jakucs, E., Bratek, Z., Beenken, L., Agerer, R. 1998. *Rhizopogon vulgaris* (Vitt.) M. Lange var. *intermedius* Svrcsek + *Pinus nigra* Arn. Descr. *Ectomyc.* 3: 111-116
- Jakucs, E., Magyar, L., Beenken, L. 1999. *Hebeloma ammophilum* Bohus + *Fumana procumbens* (Dun.) Gr. Godr. Descr. *Ectomyc.* 4: 49-54.
- Jakucs, E., Agerer, R. 1999. *Scleroderma bovista* Fr. + *Populus alba* L. Descr. *Ectomyc.* 4: 121-126.
- Jakucs, E., Agerer, R. 1999. *Tomentella pilosa* (Burt) Bourdot & Galzin + *Populus alba* L. Descr. *Ectomyc.* 4: 135-140.
- Jakucs, E., Agerer, R. 2001. *Tomentella subtestacea* Bourdot & Galzin + *Populus alba* L. Descr. *Ectomyc.* 5: 213-219.
- Jakucs, E., Beenken, L. 1999. *Russula amoenolens* Romagn. + *Populus alba* L. Descr. *Ectomyc.* 4: 115-119.
- Jakucs, E. 2002. Ectomycorrhizae of *Populus alba* L. in South Hungary. *Phyton* 42 (2) 190-210.
- Jakucs, E. 2002. *Hebeloma ammophilum*. In: Colour Atlas of Ectomycorrhizae (Agerer, R. szerk.): 145. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd

- Jakucs, E. 2002. *Inocybe heimii*. In: Colour Atlas of Ectomycorrhizae (Agerer, R. szerk.): 146. Einhorn Verlag, Schwäbisch Gmünd
- Jakucs, E., Csiha, I. 2002.-2004. Ektomikorrhiza vizsgálatok alföldi tölgyesekben. Erdészeti Kutatások 91: 39-49.
- Jakucs, E., Kovács, G. M., Szedlay, Gy., Erős-Honti, Zs. 2005. Morphological and molecular diversity and abundance of tomentelloid ectomycorrhizae in broad-leaved forests of the Hungarian Plain. Mycorrhiza 15: 459-470.
- Jakucs, E., Erős-Honti, Zs. 2008. Morphological-anatomical characterization and identification of *Tomentella* ectomycorrhizas. Mycorrhiza 18: 277-285.
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., Stalpers, J. A. 2008. Dictionary of the Fungi (10th ed.). Cromwell Press, Trowbridge
- Kovács, G. M. 2002. Mikorrhiza vizsgálatok alföldi területeken. Ph. D. értekezés. Szegedi Tudományegyetem, Növénytani Tanszék
- Kovács, G. M., Jakucs, E. 2001. "*Helianthemirhiza hirsuta*" + *Helianthemum ovatum* (Viv.) Dun. Descr. Ectomyc. 5: 49-53.
- Kovács, G. M., Jakucs, E. 2006. Morphological and molecular comparison of white truffle ectomycorrhizae. Mycorrhiza 16: 567-574.
- Kovács, G. M., Szigetvári, Cs. 2002. Mycorrhizae and other root-associated fungal structures of the plants of a sandy grassland on the Great Hungarian Plain. Phytion 42: 211-223.
- Kraigher, H., Agerer, R., Javornik, B. 1995. Ectomycorrhizae of *Lactarius lignyotus* on Norway spruce, characterized by anatomical and molecular tools. Mycorrhiza 5: 175-180.
- Magyar, L., Beenken, L., Jakucs, E. 1999. *Inocybe heimii* Bon. + *Fumana procumbens* (Dun.) Gr. Godr. Descr. Ectomyc. 4: 61-65.
- Nagy, L. 2004. Fungisztikai vizsgálatok az Alföldön 1997 és 2003 között. Mikol. Közl. 43: 15-47.
- Nagy, L., Gorliczai, Zs. 2007. Újabb adatok Magyarország gombavilágához III. Mikol. Közl. 46: 187-211.
- Rinaldi, A. C., Comandini, O., Kuyper, T. W. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. Fungal Diversity 33: 1-45.
- Robinson, D., Fitter, A. 1999. The magnitude and control of carbon transfer between plants linked by a common mycorrhizal network. Exp. Bot. 50: 9-13.
- Scannerini, S., Bonfante-Fasolo, P. 1983. The cellular basis of Plant-Fungus Interchanges in Mycorrhizal Associations. Chapman & Hall, New York

- Simard, S. W., Perry, D. A. Jones, M. D., Myrold, D. D., Durall, D. M., Molina, R. 1997. Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579-582.
- Smith M. E., Douhan G. W., Rizzo D. M. 2007. Ectomycorrhizal community structure in a xeric *Quercus* woodland based on rDNA sequence analysis of sporocarps and pooled roots. *New Phytol.* 174: 847-863.
- Smith, S. E., Smith F. A. 1990. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytol.* 114: 1-38.
- Smith, S. E., Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis (3rd ed.). Academic Press, London
- Somogyi, B. 2003. A feketefenyő (*Pinus nigra* Arnold) mikorrhizáinak vizsgálata a fülöpházi homokterületen. Diplomamunka. Szegedi Tudományegyetem, Növénytani Tanszék
- Tedersoo, L., Hansen, K., Perry, B. A., Kjoller, R. 2006. Molecular and morphological diversity of peizizalean ectomycorrhiza *New Phytol.* 170: 581-596.
- Trappe, J. M. 1996. What is mycorrhiza? In: Azcon-Aguilar, C., Barea, J. M. (szerk.) *Mycorrhiza in integrated systems-from genes to plant development.* – Proceeding of Fourth European Symposium on Mycorrhiza. Commission of the European Union, Luxembourg, pp. 3-6.
- Wang, B., Qiu, Y. L. 2006. Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.